

192005-11-03 20 JUN 2006

Microorganisme évolué pour la production de 1,2-propanediol

La présente invention concerne un nouveau procédé de préparation d'un microorganisme évolué pour la production de 1,2-propanediol, le microorganisme
5 évolué ainsi obtenu et son utilisation pour la préparation de 1,2-propanediol.

Le 1,2-propanediol ou propylène glycol, dialcool en C3, est un produit chimique utilisé dans de nombreux domaines. C'est un constituant des résines de polyesters insaturés ; des détergents liquides ; des agents de refroidissement, anti-gel et de fluide de dégivrage des avions. L'utilisation du propylène glycol est
10 en émergence depuis les années 1993-1994 en remplacement des dérivés éthyléniques qui sont reconnus comme plus toxiques que les dérivés propyléniques.

Le 1,2-propanediol est actuellement produit par voie chimique par un procédé d'hydratation d'oxyde de propylène utilisant de large quantité d'eau. La
15 production d'oxyde de propylène peut être effectuée selon deux procédés l'un utilisant de l'épichlorhydrine, l'autre de l'hydroperoxide. Ces deux voies utilisent des produits fortement toxiques. De plus, la voie de l'hydroperoxide génère des co-produits tels que le ter-butanol ou le 1 phenyl éthanol qu'il est nécessaire de valoriser pour rentabiliser la production d'oxyde de propylène. La voie chimique
20 produit généralement du 1,2-propanediol racémique alors qu'il existe deux formes de stéréoisomères le (R) 1,2 propaendiol et le (S) 1,2-propanediol dont l'intérêt n'est pas négligeable pour d'autres applications.

Ces inconvénients liés à la production chimique du 1,2-propanediol font de la voie de production biologique une alternative prometteuse. Plusieurs
25 microorganismes sont capables de produire naturellement du (S) ou (R) 1,2-propanediol à partir de sucre, tels que le glucose ou le xylose qui sont métabolisés par la voie de la glycolyse, ou encore, à partir de déoxyhexoses qui conduisent alors à la formation de (S) 1,2-propanediol (*Cameron D. C. et coll. (1998) Biotechnol. Prog.*). Parmi les microorganismes les plus performants sont à citer
30 *Clostridium sphenoides* (*Tran Din K. et coll. 1986*) et *Thermoanaerobium thermosaccharolyticum* (*Altaras N. E. and Cameron D. C. 2001*). Ce dernier est capable de fermenter plusieurs types de sucres en (R) 1,2-propanediol avec un

rendement qui varie de 0.13 à 0.28 g de 1,2-propanediol produit/ g de glucose consommé. Chez ces deux micrororganismes, les enzymes responsables de la synthèse de 1,2-propanediol n'ont pas été identifiées, et l'amélioration de leurs performances est limitée par le manque d'outils génétiques disponibles. Par ailleurs, *E. coli* possède tous les gènes nécessaires à la production de 1,2-propanediol même si *E. coli* ne produit pas naturellement du 1,2-propanediol. En effet, le 1,2-propanediol doit être produit à partir de méthyl glyoxal, un composé fortement toxique pour la cellule même à faible concentration. Aussi, des procédés utilisant des souches d'*E. coli* génétiquement modifiées afin qu'elles produisent du 1,2-propanediol ont été décrits notamment dans US 6 303 352, US 6 087 140 et WO 98/37204. Ces procédés utilisent notamment la surexpression d'une ou plusieurs enzymes impliquées dans la voie métabolique de production du 1,2-propanediol par clonage de leurs gènes dans des plasmides et donc imposent une pression de sélection à l'aide d'antibiotiques. Pour améliorer les performances des souches certains gènes endogènes sont également délétés (voir par exemple Altaras N. E. and Cameron D. C. (2000) *Biotechnol. Prog.* 16, 940-946 : Altaras N. E. and Cameron D. (1999) *Appl. Env. Microb.*, 65, 1180-1185).

Un procédé utilisant un microorganisme évolué coproduisant du 1,2-propanediol et de l'acétone, deux coproduits valorisables, n'a jusqu'alors jamais été décrit.

La présente invention concerne donc un procédé de préparation d'une souche de microorganismes évolués pour la production de 1,2-propanediol par métabolisme d'une source de carbone simple, ledit procédé comprenant la culture sous pression de sélection dans un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple, d'une souche bactérienne initiale comprenant une délétion du gène *tpiA* et une délétion d'au moins un gène impliqué dans la conversion du méthyl glyoxal (propanal) en lactate, afin de faire évoluer dans ladite souche initiale un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de biosynthèse du DHAP en méthylglyoxal puis en 1,2-propanediol vers des gènes évolués ayant une activité « 1,2-propanediol synthase » améliorée, puis on sélectionne et on

isole la ou les souches de microorganismes évolués ayant une activité « 1,2-propanediol synthase » améliorée.

Le gène *tpiA* code pour la triose phosphate isomérase qui catalyse la conversion du DHAP en glycéraldéhyde 3 phosphate. La délétion de ce gène a pour objet d'assurer la synthèse d'une quantité suffisante de méthyl glyoxal. Théoriquement, la délétion du gène *tpiA* doit permettre d'assurer que 50% du carbone du glucose métabolisé par les cellules soit affecté à la préparation du méthyl glyoxal à partir du dihydroxy acétonephosphate.

La délétion d'au moins un gène impliqué dans la conversion du méthyl glyoxal (propanal) en lactate a pour objet d'inhiber la conversion du méthyl glyoxal en lactate, de manière que l'essentiel du méthyl glyoxal présent et produit par la souche initiale, comme par la souche évoluée obtenue, soit employé par la machinerie cellulaire desdites souches pour la préparation de 1,2-propanediol.

Les gènes impliqués dans la conversion du méthyl glyoxal en lactate sont choisis parmi le gène *gloA* codant pour la glyoxylase I (catalysant la synthèse de lactoyl glutathione à partir de méthylglyoxal) et les gènes *aldA* et *aldB* codant pour une lactaldéhyde déshydrogénase (catalysant la synthèse de (S) lactate à partir de (S) lactaldéhyde). De préférence, la souche initiale comprend la délétion des trois gènes *gloA*, *aldA* et *aldB*.

De manière avantageuse, on effectue une modification supplémentaire de la souche initiale qui consiste à supprimer les voies naturelles de fermentation du glucose qui sont consommatrices d'équivalents réducteurs sous forme de NADH afin d'éliminer ces voies métaboliques qui sont en compétition avec la production de 1,2-propanediol.

On citera en particulier la délétion du gène *ldhA* codant pour la lactate déshydrogénase catalysant la synthèse de lactate à partir de pyruvate, et celle du gène *adhE* codant pour l'alcool-aldéhyde déshydrogénase catalysant la synthèse d'éthanol à partir d'acétyl-CoA.

De même, on peut obliger le microorganisme à utiliser le complexe pyruvate déshydrogénase pour produire, en anaérobiose, de l'acétyl-CoA et du NADH à partir du pyruvate. Ceci peut être obtenu en déléant les gènes *pflA* et, *pflB* codant pour la pyruvate formate lyase.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la souche initiale comprend donc également une délétion d'au moins un gène choisi parmi *ldhA*, *pflA*, *pflB* et *adhE*, de préférence la délétion des quatre gènes *ldhA*, *pflA*, *pflB* et *adhE*.

5 De manière encore plus avantageuse, la souche initiale selon l'invention comprendra également au moins un gène codant pour une enzyme favorisant en anaérobiose, le métabolisme du pyruvate en acétate.

De préférence, l'enzyme favorise, en anaérobiose, le métabolisme du pyruvate vers la production d'acétyl-CoA et de NADH. Plus préférentiellement
10 cette enzyme est un complexe pyruvate déshydrogénase.

De manière avantageuse, ledit gène codant pour une enzyme favorisant, en anaérobiose, le métabolisme du pyruvate en acétate est peu sensible à l'inhibition par le NADH.

Ce gène peut être un gène endogène, codant pour une protéine endogène,
15 ou encore un gène exogène ou hétérologue, codant pour une enzyme endogène ou exogène.

Dans le cas d'un gène endogène codant pour une protéine endogène sensible à l'inhibition par le NADH, le procédé d'évolution selon l'invention permettra de sélectionner les souches à activité « 1,2-propanediol synthase »
20 améliorée dont ledit gène codant pour une enzyme favorisant, en anaérobiose, le métabolisme du pyruvate en acétate code pour une enzyme évoluée rendue peu sensible à l'inhibition par le NADH.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, on peut introduire dans la souche initiale un gène hétérologue qui code pour une enzyme peu sensible à
25 l'inhibition par le NADH, ou codant pour une enzyme sensible, mais rendue peu sensible par la mise en œuvre du procédé d'évolution selon l'invention.

En outre, il est avantageux de déléter également le gène *edd* codant pour la 6-phospho-gluconate deshydratase, première enzyme impliquée dans la voie d'Entner Doudoroff, pour éviter la métabolisation directe du glucose en
30 glycéraldéhyde-3-phosphate et pyruvate et ainsi forcer la conversion du glucose en 1,2 propanediol et acétate

De manière avantageuse, on introduit dans la souche évoluée préalablement isolée, obtenue par le procédé d'évolution selon l'invention, un ou plusieurs gènes hétérologues codant pour une ou plusieurs enzymes impliquées dans la conversion de l'acétyl-CoA et de l'acétate en acétone, pour obtenir une souche évoluée modifiée.

Cette nouvelle modification permet de produire avec le 1,2-propanediol de l'acétone, coproduit valorisable. Cette modification a en outre l'avantage d'améliorer les performances de production en 1,2-propanediol. En effet, l'acétate est un composé inhibiteur de la croissance bactérienne à faible concentration (15 g/l) et bloque rapidement l'évolution des performances de la souche cultivée en chemostat en conditions anaérobies.

L'introduction dans la souche évoluée des gènes codant pour les enzymes catalysant la transformation de l'acétate en acétone entraîne une diminution de la concentration résiduelle en acétate lors de la culture en chemostat. De l'acétone est produit, composé largement moins inhibiteur de la croissance que l'acétate, la croissance de la souche et la production de 1,2-propanediol sont favorisées.

De manière avantageuse, le ou les gènes hétérologues codant pour une ou plusieurs enzymes impliquées dans la conversion de l'acétyl-CoA et de l'acétate proviennent de *C. acetobutylicum*. Les gènes codant pour une ou plusieurs enzymes impliquées dans la conversion de l'acétyl-CoA et de l'acétate en acétone peuvent être exprimés chromosomiquement ou extrachromosomiquement. Chromosomiquement, une ou plusieurs copies peuvent être introduites dans le génome à l'aide des méthodes de recombinaison connues de l'homme de l'art. Extrachromosomiquement, les gènes peuvent être portés par différents types de plasmides qui diffèrent par leur origine de réplication, leur nombre de copies et leur stabilité dans la cellule. Ils peuvent être présents de 1 à 5 copies, comme à 20 ou jusqu'à plus de 500 copies correspondant aux plasmides à bas nombre de copies avec une origine de réplication de type strict (pSC101, RK2), aux plasmides à bas nombre de copie (pACYC, pRSF1010) ou à grand nombre de copies (pSK bluescript II). Les gènes peuvent être exprimés en utilisant des promoteurs de différentes forces, inductibles ou non inductibles. On peut citer par exemple les promoteurs P_{trc}, P_{tac}, P_{lac}, ou d'autres promoteurs connus de

l'homme de l'art. L'expression des gènes cibles peut être augmentée ou diminuée par des éléments stabilisant ou destabilisant l'ARN messenger (Carrier and Keasling (1998) Biotechnol. Prog., 15, 58-64) ou les protéines (par exemple GSTtags, Amersham Biosciences).

5 Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, on cultive la souche évoluée modifiée obtenue précédemment sous pression de sélection dans un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple afin de faire évoluer dans ladite souche évoluée modifiée un ou plusieurs gènes impliqués dans la conversion de l'acétyl-CoA et de l'acétate en acétone vers une activité «
10 acétone synthase » améliorée, puis on sélectionne et on isole les souches de microorganismes évolués de deuxième génération ayant une activité « 1,2-propanediol synthase » améliorée et une activité « acétone synthase » améliorée.

La présente invention concerne aussi une souche initiale selon l'invention telle que définie ci-dessus, ci-après et dans les exemples.

15 Elle concerne également une souche évoluée ayant une activité « 1,2-propanediol synthase » améliorée susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention, telle que définie ci-dessus, ci-après et dans les exemples, cette définition englobant les souches évoluées de deuxième génération qui ont au surplus une activité « acétone synthase » améliorée.

20 L'invention concerne enfin un procédé de préparation de 1,2-propanediol dans lequel on cultive une souche évoluée selon l'invention dans un milieu de culture approprié comprenant une source simple de carbone, puis on récupère le 1,2-propanediol produit et le cas échéant de l'acétone, qui sont éventuellement purifiés.

25 Les souches de microorganismes modifiés, initiaux et évolués, selon l'invention peuvent être procaryotiques ou eucaryotiques, susceptibles d'être transformés et cultivés pour permettre la production de 1,2-propanediol et le cas échéant d'acétone.

30 L'homme du métier sera à même de sélectionner lesdits microorganismes au regard de ses connaissances générales dans le domaine de la biologie

cellulaire et moléculaire, et, le cas échéant, d'identifier les gènes de ces microorganismes correspondant aux gènes de *E. coli* mentionnés précédemment.

Par souche de microorganismes, on entend selon l'invention un ensemble de microorganismes d'une même espèce comprenant au moins un
5 microorganisme de ladite espèce. Ainsi, les caractéristiques décrites pour la souche s'appliquent à chacun des microorganismes de ladite souche. De même, les caractéristiques décrites pour l'un des microorganismes de la souche s'appliqueront à l'ensemble desdits microorganismes la composant.

Les microorganismes modifiés selon l'invention sont choisis parmi les
10 bactéries, les levures et les champignons, et notamment ceux des espèces suivantes : *Aspergillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Clostridium sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Escherichia sp.*, *Gluconobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Streptomyces sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Candida sp.*

15 Dans un mode de réalisation préféré, la souche bactérienne est une souche d'*Escherichia*, en particulier d'*E. coli*. Dans un autre mode de réalisation, la souche bactérienne est une souche de *Corynebacterium*, en particulier *C. glutamicum*.

Dans un autre mode de réalisation, la souche de levure est une souche de
20 *Saccharomyces*, en particulier *S. cerevisiae*

L'invention est décrite ci-dessus, ci-après et dans les exemples par rapport à *E. coli*. Ainsi, les gènes susceptibles d'être délétés ou surexprimés pour les souches évoluées selon l'invention sont définis principalement par l'emploi de la dénomination du gène de *E. coli*. Cependant, cet emploi a une signification plus
25 générale selon l'invention et englobe les gènes correspondants d'autres microorganismes. En effet en utilisant les références GenBank des gènes d'*E. coli*, l'homme du métier est capable de déterminer les gènes équivalents dans d'autres souches bactériennes qu'*E. coli*.

Les moyens d'identification des séquences homologues et de leurs
30 pourcentages d'homologie sont bien connus de l'homme du métier, comprenant notamment les programmes BLAST qui peuvent être utilisés à partir du site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> avec les paramètres indiqués par défaut sur

ce site. Les séquences obtenues peuvent alors être exploitées (e.g. alignées) en utilisant par exemple les programmes CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) ou MULTALIN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>), avec les paramètres indiqués par défaut sur ces sites.

5 En utilisant les références données sur GenBank pour les gènes qui sont connus, l'homme du métier est capable de déterminer les gènes équivalents dans d'autres organismes, souches bactériennes, levures, champignons, mammifères, plantes, etc. Ce travail de routine est avantageusement effectué en utilisant les séquences consensus pouvant être déterminées en réalisant des alignements de
10 séquences avec des gènes issus d'autres microorganismes, et en dessinant des sondes dégénérées permettant de cloner le gène correspondant dans un autre organisme. Ces techniques de routine de biologie moléculaire sont bien connues dans l'art et sont décrites par exemple dans Sambrook et al. (1989 Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring
15 Harbor, New York.).

Par « délétion », on entend selon l'invention une suppression de l'activité du gène « délété ». Cette suppression peut être une inactivation du produit d'expression du gène concerné par un moyen approprié, ou bien l'inhibition de
20 l'expression du gène concerné, ou encore la délétion d'au moins une partie du gène concerné de manière soit que son expression n'ait pas lieu (par exemple délétion d'une partie ou de l'ensemble de la région promotrice nécessaire à son expression) soit que le produit d'expression ait perdu sa fonction (par exemple délétion dans la partie codante du gène concerné). De manière préférentielle, la
25 délétion d'un gène comprend la suppression de l'essentiel dudit gène, et le cas échéant son remplacement par un gène marqueur de sélection permettant de faciliter l'identification, l'isolement et la purification des souches évoluées selon l'invention.

L'inactivation d'un gène se fait préférentiellement par recombinaison
30 homologue. (Datsenko, K.A.; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 : 6640-6645). Le principe d'un protocole en est rappelé

brièvement : un fragment d'ADN linéaire est introduit dans la cellule, lequel fragment est obtenu in vitro, comprenant les deux régions flanquant le gène, et au moins un gène de sélection entre ces deux régions (généralement un gène de résistance à un antibiotique), ledit fragment linéaire présentant donc un gène inactivé. Les cellules ayant subi un événement de recombinaison et ayant intégré le fragment introduit sont sélectionnées par étalement sur milieu sélectif. On sélectionne ensuite les cellules ayant subi un événement de double recombinaison, dans lesquelles le gène natif a été remplacé par le gène inactivé. Ce protocole peut être amélioré en utilisant des systèmes de sélections positive et négative, afin d'accélérer la détection des événements de double recombinaisons.

La technique préférentiellement utilisée pour l'introduction de ces gènes dans la souche est l'électroporation, technique bien connue de l'homme du métier. Le protocole en est rappelé brièvement : les gènes hétérologues d'intérêt sont clonés dans un vecteur d'expression entre un promoteur et un terminateur. Ce vecteur possède en outre un gène de résistance à un antibiotique afin de sélectionner les cellules le contenant et une origine de réplication fonctionnelle chez la souche hôte afin qu'il puisse se maintenir. Le protocole nécessite la préparation de cellules hôtes électrocompétentes qui sont ensuite transformées par électroporation par le vecteur.

Selon l'invention, les gènes introduits par électroporation sont préférentiellement les gènes *adc*, *ctfA* et *B*, *thl* codant respectivement pour l'acétoacétate carboxylase, la coenzyme A transférase et la thiolase de la voie naturelle de production d'acétone de *Clostridium acetobutylicum*, microorganisme reconnu comme extrêmement performant pour la production d'acétone par voie biologique.

Le procédé d'évolution selon l'invention est un procédé de préparation de microorganismes évolués permettant une modification des voies métaboliques, qui comprend de préférence les étapes suivantes :

- a) Modification d'un microorganisme pour obtenir un microorganisme initial de manière à inhiber la production ou la consommation d'un métabolite

autrement consommé ou produit lorsque les cellules du microorganisme initial est cultivé sur un milieu défini,

- b) Culture des microorganismes initiaux modifiés précédemment obtenus sur ledit milieu défini pour le faire évoluer, le milieu défini pouvant également
5 comprendre un co-substrat nécessaire à cette évolution,
- c) Sélection des cellules de microorganismes modifiés capables de se développer sur le milieu défini, éventuellement avec un co-substrat.

Un tel procédé d'évolution est décrit notamment dans la demande de brevet WO 04/076659, dont le contenu est incorporé ici par référence.

- 10 En l'espèce, la voie métabolique évoluée est la voie de biosynthèse du 1,2-propanediol, et le cas échéant la voie de biosynthèse de l'acétone.

Par « milieu défini », on entend selon l'invention un milieu de composition moléculaire connue, adapté à la croissance du microorganisme. Le milieu défini est substantiellement exempt de métabolite dont on supprime la production ou la
15 consommation en réalisant la modification.

Par « co-substrat », on entend selon l'invention une molécule carbonée ou non, différent du substrat, qui est impliqué dans une réaction et donnant un ou plusieurs atomes au substrat afin de former le produit. Le co-substrat n'a pas de propriété mutagène reconnue.

- 20 Par « sélection », on entend selon l'invention un procédé de culture, éventuellement en continu, conduit en appliquant des taux de dilution croissants de telle sorte de ne conserver dans le milieu de culture que les microorganismes ayant un taux de croissance égal ou supérieur au taux de dilution imposé. Ce faisant, on conserve les microorganismes ayant évolués de telle sorte que la
25 modification réalisée n'affecte plus la croissance.

Par « gène évolué », on entend selon l'invention une succession d'acide nucléique délimité par un codon start et un codon stop en phase et ayant, à l'issue de la sélection, au moins un acide nucléique différent par rapport à la séquence initiale.

Par « protéine évoluée », on entend selon l'invention une succession d'acides aminés (séquence protéique) ayant, à l'issue de la sélection, au moins un acide aminé différent par rapport à la séquence protéique initiale.

Les gènes et protéines peuvent être identifiées par leurs séquences primaires, mais également par homologies de séquences ou alignements qui définissent des groupes de protéines.

Les PFAM (Protein families database of alignments and Hidden Markov Models ; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) représentent une large collection d'alignements de séquences protéiques. Chaque PFAM permet de visualiser des alignements multiples, de voir des domaines protéiques, d'évaluer la répartition entre les organismes, d'avoir accès à d'autres bases de données, de visualiser des structures connues de protéines.

Les COGs (Clusters of Orthologous Groups of proteins ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) sont obtenus en comparant les séquences protéiques issus de 43 génomes complètement séquencés représentant 30 lignées phylogénétiques majeurs. Chaque COG est défini à partir d'au moins trois lignées ce qui permet ainsi d'identifier des domaines conservés anciens.

Selon l'invention, les termes « culture » et « fermentation » sont employés indifféremment pour désigner la croissance de la bactérie sur un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple.

Par source de carbone simple, selon la présente invention, on entend des sources de carbone utilisables par l'homme du métier pour la croissance normale d'un microorganisme, d'une bactérie en particulier qui peuvent être l'arabinose, le fructose, le galactose, le lactose, le maltose, le sucrose et le xylose. Une source de carbone simple tout particulièrement préférée est le glucose.

La définition des conditions de culture des microorganismes selon l'invention (fermentation) est à la portée de l'homme du métier. On fermente notamment les bactéries à une température comprise entre 20°C et 55°C, de préférence entre 25°C et 40°C, plus particulièrement d'environ 30°C pour *C. glutamicum* et *S. cerevisiae* et d'environ 34°C pour *E. coli*.

La fermentation est généralement conduite en fermenteurs avec un milieu minéral de culture de composition connu défini et adapté en fonction des bactéries utilisées, contenant au moins une source de carbone simple et le cas échéant un cofacteur nécessaire à la production du métabolite.

- 5 En particulier, le milieu minéral de culture pour *E. coli* pourra ainsi être de composition identique ou similaire à un milieu M9 (Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120-128), un milieu M63 (Miller, 1992 ; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) ou un milieu tel que défini par Schaefer *et al.* (1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96), plus particulièrement le milieu de culture minimum décrit ci-dessous :

K ₂ HPO ₄	1g/l
N.T.A	0,2g/l
solution d'oligoélément*	10ml/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1g/l
NaCl	0,2g/l
NaHCO ₃	0,2g/l
MgSO ₄	0,2g/l
glucose	20 à 100g/l
nitrate de sodium	0,424g/l
thiamine	10mg/l
FeSO ₄	50mg/l
Extrait de levure	4g/l
spectinomycine	100mg/l

Le pH du milieu est ajusté à 7,4 avec de la soude.

- *solution d'oligoélément : Acide citrique à 4g/L, Mn SO₄ à 3g/L, Na Cl à 1g/L, Co Cl₂ à 0,1g/L, Zn SO₄ à 0,10g/L, Cu SO₄ à 10mg/L, H₃ BO₃ à 10mg/L, Na Mo O₄ à 10mg/L .

De manière analogue, le milieu minéral de culture pour *C. glutamicum* pourra ainsi être de composition identique ou similaire au milieu BMCG (Liebl et

al., 1989, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 205-210) à un milieu tel que défini par Riedel *et al.* (2001, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 573-583).

La fermentation est préférentiellement réalisée en anaérobiose et en chemostat, c'est à dire, alimentée en continu, à un taux de dilution fixe, avec ledit milieu de culture minimum contenant une concentration en source de carbone fixe et étant dégazé à l'azote.

La concentration en source de carbone du milieu d'alimentation de la fermentation n'est augmentée que lorsque un régime permanent limité par la concentration en source de carbone résiduelle est atteint et stable pendant plusieurs jours.

Le mode de culture en chemostat est le mode de culture préférentiel car c'est celui qui favorise l'amélioration des performances de croissance et de production en 1,2-propanediol de la souche modifiée et conduit à isoler les microorganismes évolués.

Par activité « 1,2-propanediol synthase » améliorée, on entend selon l'invention l'ensemble des activités enzymatiques améliorées impliquées dans la voie de conversion du DHAP en 1,2-propanediol. L'activité enzymatique améliorée dans le microorganisme évolué consiste en une augmentation de la quantité de 1,2-propanediol par le microorganisme évolué par rapport aux quantités produites par le microorganisme initial correspondant, dans des conditions de culture identiques.

Par activité activité « acétone synthase » améliorée, on entend selon l'invention, l'ensemble des activités enzymatiques améliorées impliquées dans la voie de conversion de l'acétate et de l'acétyl-coA en acétone. L'activité enzymatique évoluée dans le microorganisme évolué de deuxième génération consiste en une augmentation de la quantité d'acétone produite par le microorganisme évolué de deuxième génération par rapport au microorganisme évolué transformé correspondant, dans des conditions de culture identiques.

L'invention concerne aussi l'isolement et la caractérisation des gènes évolués dans les souches évoluées obtenues par le procédé selon l'invention, et des protéines évoluées codées par lesdits gènes évolués. Ces gènes évolués peuvent être ensuite introduits dans un organisme hôte sous le contrôle

d'éléments de régulation appropriés pour son expression dans ledit organisme afin de permettre la production de la protéine évoluée correspondante.

L'amélioration de performances des microorganismes modifiés, en particulier de la souche *E. coli* MG16555 Δ *tpiA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, *ldhA* :: *kana*,
5 Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB* au cours de la culture en chemostat suggère que ces conditions de culture permettent de sélectionner un complexe pyruvate déshydrogénase endogène fonctionnel en conditions d'anaérobioses, conditions de fortes productions de NADH. Il est en effet connu que le complexe pyruvate déshydrogénase catalysant la transformation du pyruvate en acétyl-CoA en
10 libérant du NADH n'est fonctionnel qu'en aérobie, alors que lorsqu'on est en condition d'anaérobiose c'est la pyruvate formate lyase qui est fonctionnelle et catalyse la transformation du pyruvate en acétyl-CoA et formate (Snoep J. L., De Graef M. R., Westphal A. H., De Kok A. Teixeira de Mattos M. J. and Neijssel O. M. (1993). Or une des modifications effectuées, sur la souche modifiée d'*E. coli*
15 construite pour la production de 1,2-propanediol, pour produire du NADH par décarboxylation du pyruvate, est la délétion des gènes *pflA* et *pflB* codant pour l'activité pyruvate formate lyase. La seule possibilité pour la cellule modifiée est de métaboliser le pyruvate en acétyl-CoA par le complexe pyruvate déshydrogénase en produisant un NADH. Le complexe pyruvate déshydrogénase de la souche
20 modifiée évoluée a été caractérisé et est moins sensible au NADH que le complexe pyruvate déshydrogénase de la souche sauvage.

La présente invention conduit à la sélection d'un complexe pyruvate déshydrogénase fonctionnel en anaérobiose qui permet de produire deux NADH par oxydation du glycéraldéhyde-3-Phosphate en acétate, NADH qui ne peuvent
25 être réoxydés que par la voie de réduction du dihydroxyacétone-phosphate en 1,2-propanediol. La sélection d'un complexe enzymatique peu sensible au NADH favorise la vitesse de production du 1,2-propanediol.

La présente invention conduit avantageusement à la sélection de mutations du gène *lpd* (dont la séquence sauvage est connue
30 [hppt://genolist.pasteur.fr/Colibri](http://genolist.pasteur.fr/Colibri)) codant pour la lipoamide déshydrogénase du complexe pyruvate déshydrogénase. En particulier, la présence d'une mutation

ponctuelle entraînant le remplacement de l'alanine 55 par une valine a été identifié. Cette enzyme est connue pour être responsable de l'inhibition du complexe pyruvate déshydrogénase par le NADH. Cette enzyme modifiée est également partie de la présente invention.

5 La présente invention permet l'amélioration des performances des microorganismes modifiés, en particulier de la souche *E. coli* MG1655 Δ *tpiA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, *ldhA* :: *kana*, Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB* également, par évolution, au cours de la culture anaérobie en chemostat, des enzymes endogènes impliquées dans la voie de conversion du DHAP en 1,2-propanediol. L'évolution de ces
10 enzymes a pour conséquence une augmentation du taux de croissance et de la concentration finale en 1,2-propanediol.

De manière préférentielle selon l'invention la souche évoluée ne comprend pas l'évolution du gène *gldA*. Selon un mode particulier la souche d'évolution comprend une délétion du gène *gldA*.

15

Description des figures

Figure 1 : schéma du métabolisme de la souche modifiée *E. coli* pour la production de 1,2-propanediol et d'acétone selon l'invention

Légende :

20

LDH : lactate déshydrogénase

ADH : aldéhyde-alcool déshydrogénase

PFL : pyruvate formate lyase

PDHc : complexe pyruvate déshydrogénase

Figure 2 : Evolution de la souche *E. coli* MG1655 Δ *tpiA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, *ldhA* ::
25 *kana*, Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB* en culture chemostat sur glucose : concentration de glucose (figure 2A et autres produits (figure 2B).

Figure 3 : comparaison de l'activité enzymatique du complexe pyruvate déshydrogénase de la souche sauvage et de la souche évoluée selon l'invention en fonction de concentrations croissantes en NADH.

30

Les exemples de réalisation ci-dessous permettent d'illustrer l'invention, sans chercher à en limiter la portée.

Exemple 1 : construction d'une souche modifiée d'*E. coli* MG1655 Δ *tpiA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, *ldhA* ::*kana*, Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB* capable de produire uniquement du 1,2-propanediol et de l'acétate par fermentation du glucose :

5 a) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG1655 Δ *tpiA* :: *cm* :

L'inactivation du gène *tpiA* est réalisée en insérant une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en déléant la majeure partie du gène concerné. La technique utilisée est décrite par Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using
10 PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6640-6645.

Deux oligonucléotides sont utilisés pour réaliser le remplacement du gène *tpiA*:

DtpiAr de 100 bases (SEQ ID NO 1):

atgcgacatcctttagtgatgggtaactggaaactgaacggcagccgccacatgggttcacgagctgggttctaacct
15 gcgtaCATATGAATATCCTCCTTAG

avec :

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (4109007-4109087) du gène *tpiA* (séquence 4108320 à 4109087), séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

20 une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol du plasmide pKD3 (Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6640-6645)

DtpiAf de 100 bases (SEQ ID NO 2):

25 cttagcctgttagccgcttctgcagctttaacgattactgcgaaggcgctcagcttcagagaagcaccaccaacc
agcTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

avec :

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (4108320-4108400) du gène *tpiA*

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol portée par le plasmide pKD3

Les oligonucléotides DtpiAr et DtpiAf sont utilisés pour amplifier la cassette de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit PCR
5 obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans laquelle le système λ Red (γ , β , exo) exprimé favorise grandement la recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides cdh et YIIQ.

10 cdh (SEQ ID NO 3) :

ggtgatgatagttatcgccg (homologue à la séquence de 41 07536 à 4107555)

YIIQ (SEQ ID NO 4) :

cgtgccatcgacagcagtc (homologue à la séquence de 4109599 à 4109580)

La cassette de résistance au chloramphénicol est ensuite éliminée. Le
15 plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches recombinantes par électroporation (Cheperanov P. P. and Wackernagel W. (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant, gene, 158, 9-14
20). Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment.

b) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta pflAB :: cm$:

L'inactivation des gènes *pflA* et *pflB* est réalisée en insérant une cassette
25 de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en délétant la majeure partie des gènes concernés. La technique utilisée est décrite par Datsenko, K.A. et Wanner, B.L. (2000).

Deux oligonucléotides sont utilisés pour réaliser le remplacement des gènes *pflA* et *pflB* :

30 DpflB r de 100 bases (SEQ ID NO 5):

ccggacatcctgcgttgccgtaaactctggtgttctgaccggtctgccagatgcatatggccgtggccgtatcatcgg
gaCATATGAATATCCTCCTTAG

avec :

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (952235-
5 952315) du gène *pflB* (séquence 950495 à 952777), séquence de référence sur
le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de
résistance au chloramphénicol du plasmide pKD3 (Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L.
(2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using
10 PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6640-6645)

DpIfAf de 100 bases (SEQ ID NO 6):

gatgcactataagatgtgttaaaaacgctgtagcagaatgaagcgcggaataaaaaagcggcaactcaataaa
gttgccgCTGGAGCTGCTTCG

avec :

15 une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (949470-
949550) située en amont du gène *pflA* (séquence de 949563 à 950303)

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de
résistance au chloramphénicol portée par le plasmide pKD3

Les oligonucléotides pflAB1 et pflAB2 sont utilisés pour amplifier la cassette
20 de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit PCR
obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46)
dans laquelle l'enzyme Red recombinase exprimée permet la recombinaison
homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et
l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR avec les
25 oligonucléotides pflAB1 et pflAB2 .

pflAB 1 (SEQ ID NO 7) :

agacattaaaaatatacgtgcagctacccg (homologue à la séquence de 948462 à 948491)

pflAB 2 (SEQ ID NO 8) :

gtgaaagctgacaacccttttgatctttta (homologue à la séquence de 953660 à 983689)

c) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$:

5 La délétion des gènes *pflA* et *pflB* par remplacement des gènes par une cassette de résistance au chloramphenicol dans la souche MG1655 $\Delta tpiA$ a été réalisée par la technique de transduction avec le phage P1. Le protocole est constitué de deux étapes, d'une part la préparation du lysat de phage sur la souche MG1655 $\Delta pflAB ::cm$ et d'autre part, la transduction de la souche MG1655 $\Delta tpiA$ par ce lysat de phage.

10 Préparation du lysat de phage :

- Ensemencement par 100 μ l d'une culture de nuit de la souche MG1655 ($\Delta pflAB ::cm$) de 10 ml de LB + Cm 30 μ g/ml + glucose 0,2% + CaCl₂ 5 mM
- Incubation 30 min à 37°C sous agitation
- addition de 100 μ l de lysat de phage P1 préparé sur la souche sauvage
- 15 MG1655 (environ 1.10⁹ phage/ml)
- Agitation à 37°C pendant 3 heures jusqu'à la lyse totale des cellules
- Ajout de 200 μ l de chloroforme et vortex
- Centrifugation 10 min à 4500g pour éliminer les débris cellulaires
- Transfert du surnageant dans un tube stérile et ajout de 200 μ l de
- 20 chloroforme
- Conservation du lysat à 4°C

Transduction

- Centrifugation 10 min à 1500g de 5 ml d'une culture de nuit de la souche MG1655 ($\Delta tpiA$) en milieu LB
- 25 - Suspension du culot cellulaire dans 2,5 ml de MgSO₄ 10 mM, CaCl₂ 5 mM
- Tubes témoins : 100 μ l cellules
- 100 μ l phages P1 de la souche MG1655 ($\Delta pflAB ::cm$)
- Tube test : 100 μ l de cellules + 100 μ l de phages P1 de la souche MG1655 ($\Delta pflAB ::cm$)
- 30 - Incubation 30 min à 30°C sans agitation
- Ajout de 100 μ l de citrate de sodium 1 M dans chaque tube puis vortex

- Ajout de 1 ml de LB
 - Incubation 1 heure à 37°C sous agitation
 - Etalement sur des boîtes LB + Cm 30 µg/ml après centrifugation 3 min à 7000 rpm des tubes.
- 5 - Incubation à 37°C jusqu'au lendemain

Vérification de la souche

Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et l'insertion de la région contenant (*pflAB::cm*) est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides *pflAB1* et *pflAB2* d'une part, et *cdh* et *YIIQ* d'autre part, afin de vérifier également la délétion du gène *tpiA* dans la souche $\Delta pflAB :: cm$. La souche retenue est dénommée MG1655 $\Delta(pflAB :: cm, \Delta tpiA)$.

Comme précédemment, la cassette de résistance au chloramphénicol est ensuite éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment. La souche obtenue est appelée MG16555 $\Delta tpiA, \Delta pflAB$.

d) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta adhE :: cm$:

Comme précédemment l'inactivation du gène *adhE* est réalisée en insérant une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en déléant la majeure partie du gène concerné par la technique décrite par Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000).

Deux oligonucléotides sont utilisés pour réaliser la délétion :

25 DadhE r de 100 bases (SEQ ID N° 9) :

atggctgttactaatgtcgctgaacttaacgcactcgtagagcgtgtaaaaaaagcccagcgtgaatatgccagttt
cactCATATGAATATCCTCCTTAG

avec :

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (1297263-1297343) du gène *adhE* (séquence 1294669 à 1297344), séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

5 une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol du plasmide pKD3 (Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000))

DadhEf de 100 bases (SEQ ID NO 10):

caataacgaatgatagcaattttaagtagttaggaggtgaaaaatgctgtcaaaaggcgtattgtcagcgctctttt
caTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

10 avec :

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (1294694-1294774) du gène *adhE*

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol portée par le plasmide pKD3

15 Les oligonucléotides DadhEr et DadhEf sont utilisés pour amplifier la cassette de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinase exprimée permet la recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors
20 sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides ychGf et adhECr.

ychGf (SEQ ID N° 11) :

ggctcattgcaccaccatccag (homologue à la séquence de 1294357 à 1294378)

adhECr (SEQ ID N° 12) :

25 gaaaagacgcgctgacaatacgcc (homologue à la séquence de 1297772 à 1297749)

e) construction d'une souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$:

La délétion du gène *adhE* dans la souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$ est effectuée comme précédemment à l'aide de la technique de transduction à l'aide de phage P1 (voir protocole au c). Le lysat de phage P1 est effectué sur la souche

MG1655 $\Delta adhE :: cm$, et la transduction de la souche MG1655 $\Delta tpiA \Delta pflAB$ est réalisée à l'aide de ce lysat. Les transductants résistants au chloramphenicol sont contrôlés à l'aide des oligonucléotides ychCf et adhECr pour vérifier la mutation du gène *adhE* et aussi à l'aide des oligonucléotides pflAB1 et pflAB2 d'une part, et
5 cdh et YIIQ d'autre part, afin de vérifier également la délétion des gènes *pflA* et *B*, et *tpiA* dans la souche $\Delta adhE :: cm$.

Comme précédemment, la cassette de résistance au chloramphénicol est ensuite éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors
10 introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment. La souche obtenue est appelée MG16555 $\Delta tpiA, \Delta pflAB, \Delta adhE$.

f) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta tpiA, \Delta pflAB,$
15 $\Delta adhE, ldhA :: kana$:

L'inactivation du gène *ldhA* (coordonnées 1439878 à 1440867) dans la souche MG1655 $\Delta tpiA, \Delta pflAB, \Delta adhE$ a été réalisée comme précédemment à l'aide de la technique du phage P1 (voir protocole en c)). Le lysat de phage est réalisé avec la souche *E. coli* K12 NZN11 $\Delta plf :: cam, ldhA :: kana$ fourni par Clark
20 D.P. (Bunch P. K., Mat-Jan F. and Clark D. P. (1997) The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*: microbiology, 143, 187-195.). La transduction de la souche MG1655 $\Delta tpiA, \Delta pflAB, \Delta adhE$ est réalisée à l'aide du lysat de phage de la souche *E. coli* K12 NZN11 $\Delta plf :: cam, ldhA :: kana$. Les transductants sont sélectionnés sur kanamycine et l'insertion de la cassette
25 kanamycine dans le gène *ldhA* est vérifiée à l'aide des oligonucléotides hslJC et ldhAC2 .

hslJC (SEQ ID N° 13) :

gccatcagcaggcttagccg (homologue à la séquence 1439345 à 1439767)

ldhAC2 : (SEQ ID N°14) :

30 gggtattgtggcatgtttaaccg (homologue à la séquence 1441007 à 1441029)

La souche obtenue est appelée MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA::kana$

g) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta gloA::cm$:

L'inactivation du gène *gloA* est réalisée comme précédemment en insérant
5 une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en déléant la majeure partie des gènes concernés par la technique décrite par Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000).

Deux oligonucléotides sont utilisés pour réaliser la délétion :

GLOAD f de 100 bases (SEQ ID N°15)

10 atgcgtcttctcataccatgctgcgcggttgccgatttgcaacgctccatcgattttataccaaagtgcctgggcatgaa
GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

avec :

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (1725861-
1725941) du gène *gloA* (séquence 1725861 à 1726268), séquence de référence
15 sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de
résistance au chloramphénicol du plasmide pKD3 (Datsenko, K.A. and Wanner,
B.L. (2000)

GLOA D R (SEQ ID N°16)

20 ttagtgcccagaccgcgaccggcgtcttctcttcgattaactcaatttgtaaccgtccggatctccacaaacgcg
aCATATGAATATCCTCCTTAG

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (1726188 –
1726268) du gène *gloA* (1725861 – 1726268)

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de
25 résistance au chloramphénicol portée par le plasmide pKD3

Les oligonucléotides GLOADr et GLOADf sont utilisés pour amplifier la
cassette de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit
PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655
(pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinaise exprimée permet la
30 recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors

sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides Nem A C d et Rnt C r .

NemAQd (SEQ ID NO 17) :

gaagtggatcgatgccgggattgaagaatggg (homologue de 1725331 à 1725361)

5 Rnt Cr (SEQ ID NO18) :

gggttacgtttcagtgaggcgcgttctgcgg (homologue à la séquence de 1726765 à 1726795)

h) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$:

10 L'inactivation du gène *gloA* dans la souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$ a été réalisée comme précédemment à l'aide de la technique du phage P1 (voir protocole en c)). Le lysat de phage P1 est effectué sur la souche MG1655 $\Delta gloA :: cm$, et la transduction de la souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$ est réalisée à l'aide de ce lysat. Les transductants
15 résistants au chloramphénicol sont contrôlés à l'aide des oligonucléotides NemAQd et Rnt Cr pour vérifier la mutation du gène *gloA* et aussi à l'aide des oligonucléotides, *pflAB1* et *pflAB2*, *cdh* et *YIIQ*, *ychCf* et *adhECr*, *hslJC* et *ldhAC2*, afin de vérifier également respectivement la délétion des gènes *pflA* et *B*, *tpiA*, *adhE*, et *ldhA* dans la souche $\Delta gloA :: cm$.

20 Comme précédemment, la cassette de résistance au chloramphénicol est ensuite éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par
25 une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment. La souche obtenue est appelée MG16555 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$.

i) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta aldA :: cm$

30 L'inactivation du gène *aldA* est réalisée comme précédemment en insérant une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en déléant la

majeure partie des gènes concernés par la technique décrite par Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000).

Deux oligonucléotides sont utilisés pour réaliser la délétion :

5 AldA D f de 100 bases (SEQ ID N°19)

atgtcagtaccggtcaacatcctatgtatatcgatggacagtttggtacctggcgtggagacgcatggattg
atgtggtaGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

avec :

10 une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (1486256 - 1486336) du gène *aldA* (séquence 1486256 à 1487695), séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol du plasmide pKD3 (Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000)

15 aldAD r de 100 bases (SEQ ID N°20):

ttaagactgtaaataaaccacctgggtctgcagatattcatgcaagccatgtttaccatctgcgccgccaataccgg
attCATATGAATATCCTCCTTAG

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (1487615 - 1487695) du gène *aldA* (1486256 à 1487695)

20 une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol portée par le plasmide pKD3

25 Les oligonucléotides AldA D r et aldAD f sont utilisés pour amplifier la cassette de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinase exprimée permet la recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides Ydc F C f et gapCCr .

Ydc F C f (SEQ ID NO 21) :

30 tgcagcggcgccacgatggcgacgttccgccg (homologue de 1485722 à 1485752)

gapCCr (SEQ ID NO22) :

cacgatgacgaccattcatgcctatactggc (homologue à la séquence de 1488195 à 1488225)

h) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$,
5 $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$

L'inactivation du gène *aldA* dans la souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$,
ldhA :: kana, $\Delta gloA$ a été réalisée comme précédemment à l'aide de la technique
du phage P1 (voir protocole en c)). Le lysat de phage P1 est effectué sur la
souche MG1655 $\Delta aldA :: cm$, et la transduction de la souche MG1655 $\Delta tpiA$,
10 $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$ est réalisée à l'aide de ce lysat. Les
transductants résistants au chloramphénicol sont contrôlés à l'aide des
oligonucléotides Ydc F C f et gapCCr pour vérifier la mutation du gène *aldA* et
aussi à l'aide des oligonucléotides, NemAQd et Rnt Cr, *pflAB1* et *pflAB2*, *cdh* et
YIIQ, *ychCf* et *adhECr*, *hslJC* et *ldhAC2*, afin de vérifier également respectivement
15 la délétion des gènes *gloA*, *pflA* et *B*, *tpiA*, *adhE* dans la souche $\Delta aldA :: cm$.

Comme précédemment, la cassette de résistance au chloramphénicol est
ensuite éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinaise FLP agissant au
niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors
introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de
20 culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par
une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés
précédemment. La souche obtenue est appelée MG16555 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$,
ldhA :: kana, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$.

g) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG 1655 $\Delta aldB :: cm$:

25 L'inactivation du gène *aldB* est réalisée comme précédemment en insérant
une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en déléant la
majeure partie des gènes concernés par la technique décrite par Datsenko, K.A. ;
Wanner, B.L. (2000).

Deux oligonucléotides sont utilisés pour réaliser la délétion :

30 AldB D f de 100 bases (SEQ ID N°23)

tcagaacagccccaacgggttatccgagtagctcaccagcaggcacttggttgctggtaatgctccagcatcatctt
gtGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

avec :

- 5 une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (3752603-3752683) du gène *aldB* (séquence 3752603 à 3754141), séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol du plasmide pKD3 (Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000)

- 10 *aldB* D r de 100 bases (SEQ ID N°24):

atgaccaataatcccccttcagcacagattaagcccggcgcgagtatggtttccccctcaagttaaaagcccgctatg
acaaCATATGAATATCCTCCTTAG

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (3754061-3754141) du gène *aldB* (3752603 à 3754141)

- 15 une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol portée par le plasmide pKD3.

Les oligonucléotides AldB D r et aldB D f sont utilisés pour amplifier la cassette de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655
20 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinaise exprimée permet la recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides aldB C f et YiaYCr .

aldB C f (SEQ ID NO 25) :

- 25 catatttcctcaaagaatataaaaaagaacaattaacgc (homologue à la séquence de 3752057 à 3752095)

YiaYCr (SEQ ID NO26) :

tatgttcatgcgatggcgcaccagctgggcg (homologue à la séquence de 3754644 à 3754674)

h) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$

L'inactivation du gène *aldB* dans la souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$ a été réalisée comme précédemment à l'aide de la technique du phage P1 (voir protocole en c)). Le lysat de phage P1 est effectué sur la souche MG1655 $\Delta aldB :: cm$, et la transduction de la souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$ est réalisée à l'aide de ce lysat. Les transductants résistants au chloramphénicol sont contrôlés à l'aide des oligonucléotides *aldB* C f et YiaYCr pour vérifier la mutation du gène *aldB* et aussi à l'aide des oligonucléotides, NemAQd et Rnt Cr, *pflAB1* et *pflAB2*, *cdh* et YIIQ, *ychCf* et *adhECr*, *hslJC* et *ldhAC2*, Ydc F C f et *gapCCr*, afin de vérifier également respectivement la délétion des gènes *gloA*, *pflA* et *B*, *tpiA*, *adhE*, *aldA* dans la souche $\Delta aldB :: cm$.

Comme précédemment, la cassette de résistance au chloramphénicol est ensuite éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinaise FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment. La souche obtenue est appelée MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$.

Exemple 2 : Culture et évolution de la souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ en chemostat :

Pour optimiser la production de 1,2-propanediol à partir de glucose par la souche *E. coli* MG16555 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, une culture de la souche en chemostat, dans un milieu de culture minimum, supplémenté en nitrate de sodium et en extrait de levure, pendant plusieurs semaines, est réalisée en condition d'anaérobiose.

Au début de la culture, la concentration initiale en glucose dans le bidon d'alimentation de la culture est de 20 g/l, le taux de dilution est de 0,04h⁻¹ et un

flux d'azote continu est maintenu pour réaliser les conditions d'anérobiose. La concentration cellulaire et les productions en 1,2-propanediol et acétate sont faibles. Après plusieurs semaines de culture, la croissance et les concentrations en produits augmentent, un régime permanent est atteint caractérisé par une concentration en glucose résiduel et des concentrations en produits constantes (figure 2).

Exemple 3 : Caractérisation d'un complexe pyruvate déshydrogénase évolué peu sensible au NADH :

L'évolution du complexe pyruvate déshydrogénase (PDHc) vers un PDHc peu sensible au NADH est mis en évidence à la fois par un dosage de l'activité de l'enzyme évoluée *in vitro*, et, par comparaison de la séquence d'un des gènes (*lpa*) codant pour la lipoamide déshydrogénase du PDHc évolué avec celle du gène du PDHc natif.

a) dosage de l'activité enzymatique du complexe pyruvate déshydrogénase :

Le dosage de l'activité enzymatique du PDHc *in vitro* de la souche *E. coli** MG1655 Δ *tpiA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, *ldhA* :: *kana*, Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB* est effectué selon le protocole décrit par Schwartz et Reed (Schwartz E. R. and Reed L. J. (1970) Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli*, Biochemistry, 6,1434-1439).

Un volume de 100 ml de culture cellulaire est prélevé du chemostat dans des fioles préalablement dégazées et rentrées sous une hotte anaérobie. Les cellules sont centrifugées 10 minutes à 6000 rpm. Le culot est mis en suspension dans environ 100 ml de tampon phosphate de potassium 50 mM, pH7.9, 0.5 mM thiamine pyrophosphate, puis centrifugées de nouveau 10 minutes à 6000 rpm. Le lavage est effectué une deuxième fois dans les mêmes conditions. Le culot cellulaire est mis en suspension dans 800µl de tampon. La suspension cellulaire est désintégrée au moyen d'un appareil à ultrasons en 4 cycles de traitement (30 secondes à 30%), entrecoupés de 2 minutes de repos dans de la glace. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation 5 minutes à 13400 rpm, le

5 surnageant est l'extrait acellulaire brut. Les sels présents dans l'extrait acellulaire, susceptibles d'interférer dans le dosage enzymatique, sont éliminés par passage de l'extrait à travers une colonne PD10 équilibrée avec du tampon phosphate de potassium pH 7,9, 0,5mM de thiamine pyrophosphate. L'extrait est élué avec 3,5ml du même tampon que précédemment. L'éluat récupéré est l'extrait acellulaire brut.

10 L'activité enzymatique de l'extrait acellulaire brut est mesurée dans un premier temps en absence de NADH, puis dans un deuxième temps en présence de concentrations croissantes de NADH de 0.14 mM à 2.7 mM. Les résultats obtenus sont comparés avec ceux présentés dans la littérature pour la souche d'*E. coli* sauvage figure n° 3 (Snoep J. L., De Graef M. R., Westphal A. H., De Kok A. Teixeira de Mattos M. J. and Neijssel O. M. (1993) Differences in sensitivity to NADH of purified pyruvate dehydrogenase complexes of *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Azotobacter vinelandii* and *Escherichia coli*: implications for their activity *in vivo*, FEMS microbiology letters, 114,279-284)).

20 Les résultats obtenus indiquent que le PDHc de la souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ évoluée est moins sensible au NADH que la souche sauvage d'*E. coli*. Pour un rapport $[NAD^+]/[NADH] \cong 33$, une inhibition totale de l'activité du PDHc de la souche sauvage est observée, alors que 80% de l'activité du PDHc évolué est mesurée.

b) Détermination de la séquence du gène *lpd* codant pour la lipoamide déshydrogénase du complexe pyruvate déshydrogénase de la souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ évoluée :

25 L'ADN chromosomique de la souche *E. coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ est extrait à partir de 1 ml d'une culture de nuit en LB. Après centrifugation, les cellules sont lavées avec de l'eau stérile puis éclatées par choc thermique 5 minutes à 94°C. L'ADN chromosomique est récupéré dans le surnageant après centrifugation. Le gène *lpd* (séquence 127912 à 129336) codant pour la lipoamide déshydrogénase (E3) du complexe pyruvate déshydrogénase est amplifié par PCR à l'aide des deux oligonucléotides suivants :

30

AceEf (SEQ ID N°27)

cgcgatgatcgacgggtgctgatgggtgccc (homologue à la séquence 127504 à 127532)

YacH r (SEQ ID N°28)

aagttcaggagagccgccc (homologue à la séquence 127513 à 129531)

- 5 Un produit PCR de 2000 paires de bases correspondant au gène *lpd* est obtenu et séquencé. Les résultats obtenus montrent la présence d'une mutation ponctuelle entraînant le remplacement de l'alanine 55 par une valine.

Exemple 4 : La voie de conversion du méthyl glyoxal en 1,2-propanediol de la souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ évoluée n'implique pas la glycérol déshydrogénase :

Afin de montrer que l'amélioration des performances de la souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ évoluée n'est pas liée à une évolution de la glycérol déshydrogénase codée par le gène *gldA*, une souche *E. coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ évoluée chez laquelle le gène *gldA* est délété a été construite.

a) construction d'une souche modifiée MG1655 $\Delta gldA :: cm$:

L'inactivation du gène *gldA* est réalisée comme indiqué dans l'exemple 1 en insérant une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en déléant la majeure partie des gènes concernés par la technique décrite par Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000).

Deux oligonucléotides sont utilisés pour réaliser la délétion :

gldA D f de 100 bases (SEQ ID N°29)

gttattcccactcttgacaggaaacgctgaccgtactggctcggctaccagcagagcggcgtaaaccctgatctggcgt

25 cgcgGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

avec :

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (4135512 à 4135592) du gène *gldA* (séquence 4135512 à 4136615), séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

5 une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol du plasmide pKD3 (Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000)

gldA D r de 100 bases (SEQ ID N°30):

atggaccgcattattcaatcaccgggttaaatacatccagggcgctgatgtgattaatcgtctgggcgaatacctgaa
gccCATATGAATATCCTCCTTAG

10 une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (4136535-4136615) du gène *gldA* (4135512 à 4136615)

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol portée par le plasmide pKD3

15 Les oligonucléotides *gldA D r* et *gldA D f* sont utilisés pour amplifier la cassette de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinaise exprimée permet la recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse
20 PCR avec les oligonucléotides *YijF D* et *TalCr*.

YijF D (SEQ ID NO 31):

gcctggattgtaccacgggttggtggaacggcggg (homologue à la séquence de 4135140 à 4135174)

TalCr (SEQ ID NO 32):

25 cacgcatattccccattgccgggg (homologue à la séquence de 4137216 à 4137239)

Un produit PCR de 2100 pb est obtenu pour le gène sauvage comme pour le gène délété et remplacé par le gène de résistance au chloramphénicol. Aussi, les produits PCR obtenus sont ensuite digérés par l'enzyme de restriction *Sall*. Deux

fragments d'environ 1000 pb sont obtenus pour le produit PCR sauvage alors que le produit PCR contenant le gène de résistance au chloramphénicol n'est pas digéré.

- 5 b) construction d'une souche modifiée MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ $\Delta gldA :: cm$ évoluée

L'inactivation du gène *gldA* dans la souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ évoluée a été réalisée comme dans l'exemple 1 à l'aide de la technique du phage P1 (voir protocole en c)). Le lysat de phage P1 est effectué sur la souche MG1655 $\Delta gldA :: cm$, et la transduction de la souche
10 MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$ est réalisée à l'aide de ce lysat. Les transductants résistants au chloramphénicol sont contrôlés à l'aide des oligonucléotides YijF D et TalCr pour vérifier la mutation du gène *gldA*.

- 15 c) Culture des souches modifiées *E. coli**MG 1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ $\Delta gldA :: cm$ évoluée et *E. coli**MG 1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ évoluée :

Les deux souches modifiées *E. coli**MG 1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ $\Delta gldA :: cm$ évoluée et *E. coli**MG 1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ évoluée sont cultivées à pH non régulé dans un milieu de culture minimum supplémenté en nitrate de sodium et en extrait
20 de levure avec une concentration initiale en glucose de 20g/l en condition d'anaérobiose pendant 10 jours. Le profil de produits de fermentation obtenu montre que la délétion du gène *gldA* n'entraîne pas une diminution de la production de 1.2 propanediol (tableau 1).

- 25 Tableau 1: Comparaison des concentrations en substrat et produits de fermentation après 10 jours de culture des souches modifiées *E. coli**MG 1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ $\Delta gldA :: cm$ évoluée et *E. coli**MG 1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ évoluée :

Souches	Densité optique	Glucose consommé (g/l)	Méthyl glyoxal (g/l)	Acide acétique (g/l)	1.2 propanediol (g/l)
<i>E. coli</i> *MG 1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $dhA ::$ <i>kana</i> , $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, $\Delta gldA ::cm$	1,5	7,3	1,2	2,1	1,7
<i>E. coli</i> *MG 1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $dhA ::$ <i>kana</i> , $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$,	1,9	9,6	1,4	1,9	1,2

Exemple 5 : Amélioration du rendement de conversion du glucose en 1.2 propanediol par délétion du gène *edd* codant pour la 6-phospho-gluconate déshydratase dans la souche *E. coli* *MG 1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, *ldhA* ::
5 *kana*, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ évoluée :

a) construction d'une souche modifiée MG1655 $\Delta edd::cm$:

L'inactivation du gène *edd* est réalisée comme indiqué dans l'exemple 1 en insérant une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en déléant la majeure partie des gènes concernés par la technique décrite par
10 Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000).

Deux oligonucléotides sont utilisés pour réaliser la délétion :

edd D f de 100 bases (SEQ ID N°33)

ttaaaaagtgtatagaggttgccgctgttcggcaccggacagtttttcacgcaaggcgctgaataattcacgtcctgt

tcGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

15 avec :

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (1930817 à 4) du gène *edd* (séquence 1930817 à 1932628), séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>

5 une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol du plasmide pKD3 (Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000)

edd D r de 100 bases (SEQ ID N°34):

atgaatccacaattgttacgcgtaacaaatcgaatcattgaacggtcgcgcgagactcgctctgcttatctcgcccg
atCATATGAATATCCTCCTTAG

10 une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (1932548-1932628) du gène *edd* (séquence 1930817 à 1932628)

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol portée par le plasmide pKD3

15 Les oligonucléotides *edd* D r et *edd* D f sont utilisés pour amplifier la cassette de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinase exprimée permet la recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse
20 PCR avec les oligonucléotides *eda* d et *zwf* r :

Eda d (SEQ ID NO 35) :

CCCCGGAATCAGAGGAATAGTCCC (homologue à la séquence de 1930439 à 1930462)

Zwf r (SEQ ID NO 36) :

25 GGGTAGACTCCATTACTGAGGCGTGGGCG (homologue à la séquence de 1932968 à 1932996)

- b) construction d'une souche modifiée MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ $\Delta edd :: cm$ évoluée

L'inactivation du gène *edd* dans la souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ évoluée a été réalisée comme dans l'exemple 1 à l'aide de la technique du phage P1 (voir protocole en c)). Le lysat de phage P1 est effectué sur la souche MG1655 $\Delta edd :: cm$, et la transduction de la souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ est réalisée à l'aide de ce lysat. Les transductants résistants au chloramphenicol sont contrôlés à l'aide des oligonucléotides *eda d* et *zwf r* pour vérifier la mutation du gène *edd*.

- 10 c) Culture des souches modifiées *E. coli* *MG 1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, $\Delta edd :: cm$ évoluée et *E. coli* *MG 1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ évoluée :

Les deux souches modifiées *E. coli* *MG 1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, $\Delta edd :: cm$ évoluée et *E. coli* *MG 1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ évoluée sont cultivées à pH non régulé dans un milieu de culture minimum supplémenté en nitrate de sodium et en extrait de levure avec une concentration initiale en glucose de 20g/l en condition d'anaérobiose pendant 10 jours. Le profil de produits de fermentation obtenu montre que la délétion du gène *edd* entraîne une augmentation du rendement de conversion du glucose en 1,2-propanediol de 0,13 g/g à 0,35 g/g (tableau 2). La délétion du gène *edd* dans la souche *E. coli* *MG 1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ évoluée permet donc d'améliorer les performances de la souche.

- 25 Tableau 2 : Comparaison des concentrations en substrat et produits de fermentation après 10 jours de culture des souches modifiées *E. coli* *MG 1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ $\Delta edd :: cm$ évoluée et *E. coli* *MG 1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ évoluée :

Souches	Densité optique	Glucose consommé (g/l)	Méthyl glyoxal (g/l)	Acide acétique (g/l)	1,2- propanediol (g/l)	Y 1.2 pdiol/glucose (g/g)
<i>E. coli</i> * $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $dhA ::$ <i>kana</i> , $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, $\Delta edd :: cm$	1,2	5	0,2	1,5	1,8	0,35
<i>E. coli</i> * $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $dhA ::$ <i>kana</i> , $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$,	1,9	9,6	1,4	1,9	1,2	0,13

Exemple 6 : Construction d'une souche modifiée *E. Coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, $\Delta edd :: cm$ (pSOS95T) capable de produire du 1,2-propanediol et de l'acétone :

- 5 Le plasmide appelé pSOS95T est un vecteur navette d'expression pour *E. coli*/*C. acetobutylicum* portant l'opéron acétone de *Clostridium acetobutylicum* constitué de quatre gènes *adc*, *ctfAB*, *thl* codant respectivement pour l'acétoacétate carboxylase, la coenzyme A transférase et la thiolase sous la dépendance du promoteur thiolase. Ces trois enzymes catalysent la
- 10 transformation de l'acétyl-CoA et de l'acétate en acétone et dioxyde de carbone. Le plasmide pSOS95T a été obtenu par insertion dans le plasmide pSOS95 (Gene bank numéro d'accèsion AY187686) du gène *thl* de *C. acetobutylicum* codant pour la thiolase, au site BamH1 situé entre le promoteur thiolase et le gène *ctfA*. Le plasmide pSOS95T est introduit dans la souche *E. coli** MG1655 $\Delta tpiA$,
- 15 $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, $\Delta edd :: cm$ évoluée par électroporation.

Des cellules électrocompétentes de la souche *E. coli** MG1655 Δ *tpiA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, *ldhA* :: *kana*, Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB*, Δ *edd* :: *cm* sont préparées à partir d'une culture de nuit de la souche en LB. Une culture de 10 ml LB en erlenmeyer estensemencée au 100^{ième} par la culture de nuit et incubée à 37°C.

- 5 Lorsque la densité optique à 550 nm de la culture atteint une valeur comprise entre 0.4 et 0.6, 1 ml de culture est centrifugée. Les cellules sont lavées avec de l'eau, puis avec une solution de glycérol à 10%, avec d'être resuspendues dans 0.05 ml de d'une solution de glycérol à 10 %. Les cellules sont électroporées immédiatement (25 μ F, 200 Ω , 2.5KV) (Gene pulser, Biorad) avec 5 μ l de la
- 10 préparation plasmidique pSOS95T (Qiagen, Hilden germany). Après 1 heure d'expression phénotypique en milieu SOC (Sambrook J., Fristch E. F. and Maniatis T. (1989) Molecular cloning : a laboratory manual, 2 nd ed Cold Spring Harbor Laboratory, cold Spring Harbor, N.Y.) à 37°C, les transformants sont sélectionnés sur milieu gélosé avec de la carbenicilline 100 μ g/ml à 37°C.

- 15 Les transformants sont remis en culture liquide en présence de carbénicilline pendant une nuit pour réaliser une extraction d'ADN plasmidique (Qiagen, Hilden Germany) afin de contrôler la présence du plasmide pSOS95T et de vérifier par digestion enzymatique qu'il est correct.

- 20 Exemple 7 : Culture de la souche modifiée *E. coli**MG1655 Δ *tpiA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, *ldhA* :: *kana*, Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB*, Δ *edd* :: *cm* (pSOS95T) évoluée capable de produire du 1,2-propanediol et de l'acétone :

- La souche modifiée *E. coli** MG1655 Δ *tpiA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, *ldhA* :: *kana*, Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB* Δ *edd* :: *cm* (pSOS95T) évoluée est cultivée à pH non régulé
- 25 dans un milieu de culture minimum supplémenté en nitrate de sodium et en extrait de levure avec une concentration initiale en glucose de 20g/l en condition d'anaérobiose (tableau 3). Le dosage des produits de fermentation montre que la souche *E. Coli** MG1655 Δ *tpiA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, *ldhA* :: *kana*, Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB* Δ *edd* :: *cm* (pSOS95T) évoluée produit un mélange de 1,2-propanediol, d'acétate
- 30 et d'acétone.

Tableau 3 : Comparaison des concentrations en substrat et produits de fermentation après 10 jours de culture des souches modifiées *E. coli* *MG 1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, $\Delta edd :: cm$ évoluée et *E. coli* *MG 1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, $\Delta edd :: cm$ évoluée :

Souches	Densité optique	Glucose consommé (g/l)	Méthyl glyoxal (g/l)	Acide acétique (g/l)	1,2- propanediol (g/l)	Acétone (g/l)
<i>E. coli</i> * $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $dhA ::$ <i>kana</i> , $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, $\Delta edd :: cm$ (pSOS95T)	1,4	4,8	0,3	1,3	1,6	0,1
<i>E. coli</i> * $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA ::$ <i>kana</i> , $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, $\Delta edd :: cm$	1,2	5	0,2	1,5	1,8	/

REFERENCES

- ✓ Altaras N. E. and Cameron D. (1999) Metabolic engineering of a 1,2-propanediol pathway in *Escherichia coli* : *Appl. Env. Microb.*, 65, 1180-1185.
- 5 ✓ Altaras N. E. and Cameron D. C. (2000) Enhanced production of (R) 1,2-propanediol by metabolically engineered *Escherichia coli* : *Biotechnol. Prog.* 16, 940-946
- ✓ Altaras NE, Etzel MR and Cameron DC. (2001) Conversion of sugars to 1,2-propanediol by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* HG-8 : *Biotechnol. Prog.* 17, 52-56
- 10 ✓ Bunch P. K., Mat-Jan F. and Clark D. P. (1997) The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*: *microbiology*, 143, 187-195.
- 15 ✓ Cameron D. C., Altaras N. E., Hoffman M. L. and Shaw A. J. (1998) Metabolic engineering of propanediol pathways : *Biotechnol. Prog.*, 14, 116-125.
- ✓ Cameron D. C., Shaw A. J. and Altaras N. E. (1998) Microbial production of 1,2-propanediol from sugar WO 98/37204
- 20 ✓ Cameron D. C., Shaw A. J. and Altaras N. E. (2000) Microbial production of 1,2-propanediol from sugar US 6 087 140
- ✓ Cameron D. C., Shaw A. J. and Altaras N. E. (2001) Microbial production of 1,2-propanediol from sugar US 6 303 352
- ✓ Carrier T A and Keasling J. D. (1999) Library of synthetic 5' secondary structures to manipulate mRNA stability in *Escherichia coli*, *Biotechnol. prog.*, 15, 58-64
- 25 ✓ Cheperanov P. P. and Wackernagel W. (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant, *gene*, 158, 9-14
- 30 ✓ Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6640-6645

- ✓ Sambrook J., Fristch E. F. and Maniatis T. (1989) Molecular cloning : a laboratory manual, 2 nd ed Cold Spring Harbor Laboratory, cold Spring Harbor, N.Y.
- 5 ✓ Schwartz E. R. and Reed L. J. (1970) Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli*, *Biochemistry*, 6,1434-1439
- 10 ✓ Snoep J. L., De Graef M. R., Westphal A. H., De Kok A. Teixeira de Mattos M. J. and Neijssel O. M. (1993) Differences in sensitivity to NADH of purified pyruvate dehydrogenase complexes of *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Azotobacter vinelandii* and *Escherichia coli*: implications for their activity *in vivo*, *FEMS microbiology letters*, 114, 279-284)).
- 15 ✓ Tran Din K. and Gottschalk G. (1985) Formation of D(-)-1,2-propanediol and D(-)-lactate from glucose by *Clostridium sphenoides* under phosphate limitation : *Arch. Microbiol.* 142, 87-92.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation d'une souche de microorganismes évolués pour la production de 1,2-propanediol par métabolisme d'une source de carbone simple, ledit procédé comprenant la culture sous pression de sélection dans un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple, d'une souche bactérienne initiale comprenant une délétion du gène *tpiA* et une délétion d'au moins un gène impliqué dans la conversion du méthyl glyoxal (propanal) en lactate, afin de faire évoluer dans ladite souche initiale un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de biosynthèse du DHAP en méthylglyoxal puis en 1,2-propanediol vers des gènes évolués ayant une activité « 1,2-propanediol synthase » améliorée, puis on sélectionne et on isole la ou les souches de microorganismes évolués ayant une activité « 1,2-propanediol synthase » améliorée.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le gène impliqué dans la conversion du méthyl glyoxal en lactate est choisi parmi *gloA*, *aldA* et *aldB*.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la souche initiale comprend la délétion des gènes *gloA*, *aldA*, *aldB* et *tpiA*.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la souche initiale comprend également une délétion des gènes *ldhA*, *pflA*, *pflB*, *adhE* et *edd*.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la souche initiale comprend également au moins un gène codant pour une enzyme favorisant le métabolisme du pyruvate en acétate.
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'enzyme favorisant le métabolisme du pyruvate en acétate est peu sensible à l'inhibition par le NADH.
7. Procédé selon l'une des revendications 5 ou 6, caractérisé en ce que ladite enzyme favorise le métabolisme du pyruvate vers la production d'acétyl-CoA et de NADH.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'enzyme est un complexe pyruvate déshydrogénase.
9. Procédé selon l'une des revendications 6 à 8, caractérisé en ce que l'enzyme favorisant le métabolisme du pyruvate en acétate est une enzyme endogène.
10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'on introduit dans la souche évoluée un ou plusieurs gènes hétérologues codant pour une ou plusieurs enzymes impliquées dans la conversion de l'acétyl-CoA et de l'acétate en acétone.
- 10 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le ou les gènes hétérologues codant pour une ou plusieurs enzymes impliquées dans la conversion de l'acétyl-CoA et de l'acétate proviennent de *C. acetobutylicum*.
- 15 12. Procédé selon l'une des revendications 10 ou 11, caractérisé en ce l'on cultive sous pression de sélection dans un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple une souche évoluée modifiée obtenue selon l'une des revendications 10 ou 11 afin de faire évoluer dans ladite souche évoluée modifiée un ou plusieurs gènes impliqués dans la conversion de l'acétyl-CoA et de l'acétate en acétone vers une activité
20 « acétone synthase » améliorée, puis on sélectionne et on isole les microorganismes évolués de deuxième génération ayant une activité « 1,2-propanediol synthase » améliorée et une activité « acétone synthase » améliorée.
- 25 13. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la souche est choisie parmi les bactéries, les levures et les champignons.
14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que la souche est choisie parmi une souche d'*Escherichia*, en particulier *E. coli*, et de *Corynebacterium*, en particulier *C. glutamicum*.
15. Souche initiale telle que définie selon l'une des revendications 1 à 9.
- 30 16. Souche évoluée susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 14.

17. Souche selon la revendication 16, dans laquelle le gène *lpd* porte une mutation ponctuelle entraînant une modification de l'alanine 55 en valine.
18. Procédé de préparation de 1,2-propanediol dans lequel on cultive une souche évoluée selon l'une des revendications 16 ou 17 dans un milieu de culture approprié comprenant une source simple de carbone, puis on récupère le 1,2-propanediol produit.
19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que l'on récupère du 1,2-propanediol et de l'acétone.
20. Procédé selon l'une des revendications 18 ou 19, caractérisé en ce que le 1,2-propanediol et/ou l'acétone sont purifiés.

1/3

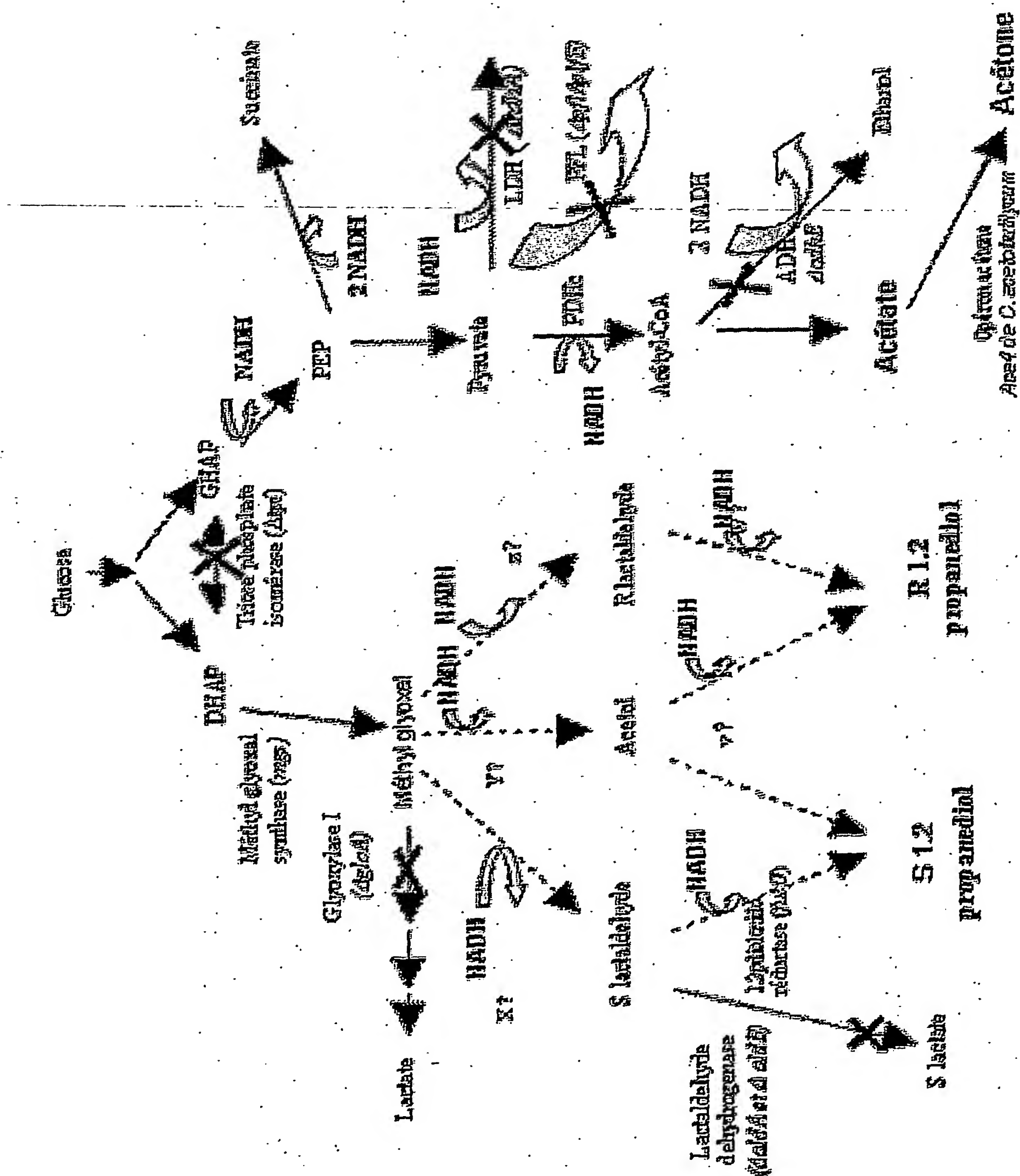


Fig 1

2/3

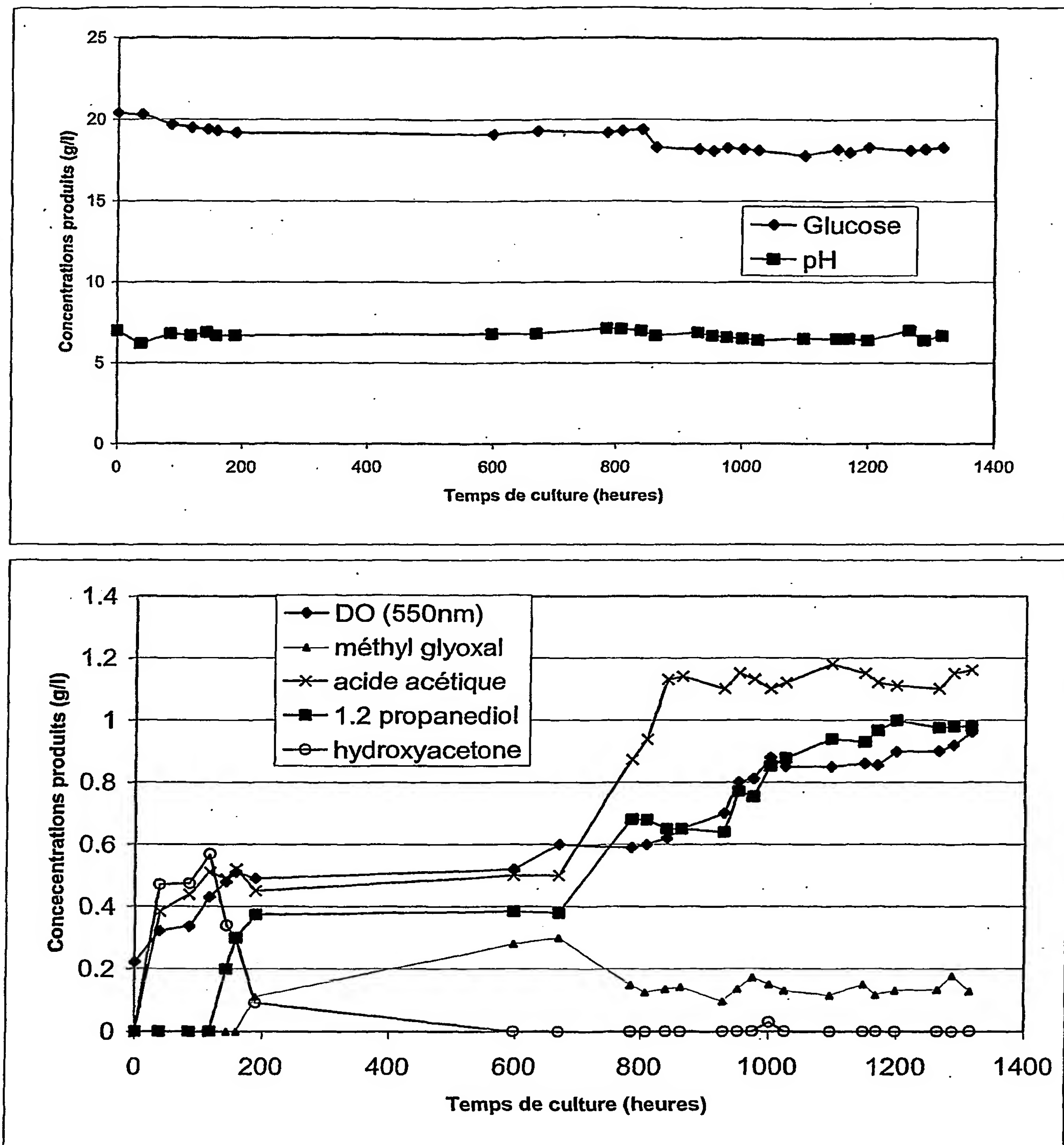


Fig 2 A et B

3/3

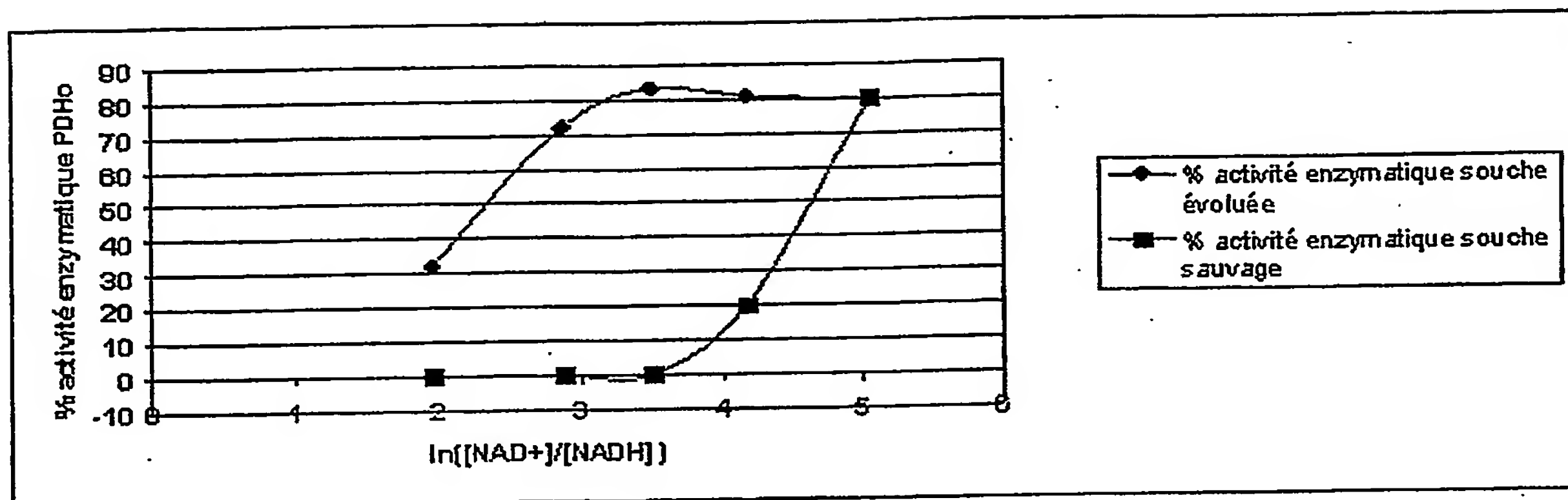


Fig 3

342276 PCT.ST25110105.txt
SEQUENCE LISTING

10/385040

JUN 2006

<110> Metabolic Explorer

<120> Microorganisme Evolué pour la Production de 1,2-propanediol

<130> 347276

<150> FR 0400214

<151> 2004-01-12

<160> 36

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 102

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 1

atgcgacatc ctttagtgat gggtaactgg aaactgaacg gcagccgcca catggttcac 60

gagctggttt ctaacctgcg tacatatgaa taccctcctt ag 102

<210> 2

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 2

cttaagcctg tttagccgct tctgcagctt taacgattac tgcgaaggcg tcagctttca 60

gagaagcacc accaaccagc tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

342276 PCT.ST25110105.txt

<213> Artificial

<400> 3

ggtgatgata gttatcgccg

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 4

cgtgccatcg acagcagtc

20

<210> 5

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 5

ccggacatcc tgcgttgccg taaatctggt gttctgaccg gtctgccaga tgcatatggc 60

cgtggccgta tcatcggtga catatgaata tcctccttag 100

<210> 6

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 6

gatgcactat aagatgtgtt aaaaacgctg tagcagaatg aagcgcgga taaaaaagcg 60

gcaactcaat aaagttgccg ctggagctgc ttcg 94

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 7

agacatta aatatacgtg cagctacccg

30

342276 PCT.ST25110105.txt

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 8

gtgaaagctg acaacccttt tgatctttta

30

<210> 9

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 9

atggctgtta ctaatgtcgc tgaacttaac gcactcgtag agcgtgtaaa aaaagcccag

60

cgtgaatatg ccagtttcac tcatatgaat atcctcctta g

101

<210> 10

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 10

caataacgaa tgatagcaat tttaagtagt taggaggtga aaaatgctgt caaaaggcgt

60

attgtcagcg cgtcttttca tgtaggctgg agctgcttcg

100

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 11

ggctcattgc accaccatcc ag

22

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

342276 PCT.ST25110105.txt

<400> 12
gaaaagacgc gctgacaata cgcc 24

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 13
gccatcagca ggcttagccg 20

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 14
gggtattgtg gcatgtttaa ccg 23

<210> 15

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 15
atgcgtcttc ttcataccat gctgcgcgtt ggcgatttgc aacgctccat cgatttttat 60
accaaagtgc tgggcatgaa gtgtaggctg gagctgcttc g 101

<210> 16

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 16
ttagttgccc agaccgcgac cggcgtcttt ctcttcgatt aactcaattt tgtaaccgtc 60
cggatcttcc acaaacgcga catatgaata tcctccttag 100

<210> 17

342276 PCT.ST25110105.txt

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 17

gaagtgggtcg atgccgggat tgaagaatgg g

31

<210> 18

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 18

gggttacgtt tcagtgaggc gcgttctgcg g

31

<210> 19

<211> 102

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 19

atgtcagtac ccgttcaaca tcctatgtat atcgatggac agtttggttac ctggcgtgga 60

gacgcatgga ttgatgtggt agtgtaggct ggagctgctt cg 102

<210> 20

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 20

ttaagactgt aaataaacca cctgggtctg cagatattca tgcaagccat gtttaccatc 60

tgcgccgcca ataccggatt tcatatgaat atcctcctta g 101

<210> 21

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

342276 PCT.ST25110105.txt

<400> 21
tgcagcggcg cacgatggcg acgttccgcc g 31

<210> 22

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 22
cacgatgacg accattcatg cctatactgg c 31

<210> 23

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 23
tcagaacagc cccaacgggtt tatccgagta gctcaccagc aggcacttgg ttgctggta 60
atgctccagc atcatcttgt gtgtaggctg gagctgcttc g 101

<210> 24

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 24
atgaccaata atcccccttc agcacagatt aagcccggcg agtatgggtt cccctcaag 60
ttaaaagccc gctatgacaa catatgaata tcctccttag 100

<210> 25

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 25
catatttccc tcaaagaata taaaaaagaa caattaacgc 40

<210> 26

<211> 31

342276 PCT.ST25110105.txt

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 26

tatgttcatg cgatggcgca ccagctgggc g

31

<210> 27

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 27

cgcgtgatcg acggtgctga tgggtgcccg

29

<210> 28

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 28

aagttcagga gagccgccc

19

<210> 29

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 29

gttattccca ctcttgcagg aaacgctgac cgtactggtc ggctaccagc agagcggcgt

60

aaacctgatc tggcgtcgcg gtgtaggctg gagctgcttc g

101

<210> 30

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 30

atggaccgca ttattcaatc accgggtaaa tacatccagg gcgctgatgt gattaatcgt

60

ctgggcgaat acctgaagcc catatgaata tcctccttag

100

342276 PCT.ST25110105.txt

<210> 31

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 31

gcctggattt gtaccacggt tgggtggaacg gcggg

35

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 32

cacgcatatt ccccataggc gggg

24

<210> 33

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 33

ttaaaaagtg atacagggtg cgccctgttc ggcaccggac agtttttcac gcaaggcgct

60

gaataattca cgtcctgttc gtgtaggctg gagctgcttc g

101

<210> 34

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 34

atgaatccac aattgttacg cgtaacaaat cgaatcattg aacgttcgcg cgagactcgc

60

tctgcttatc tcgcccggat catatgaata tcctccttag

100

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

342276 PCT.ST25110105.txt

<213> Artificial

<400> 35

ccccggaatc agaggaatag tccc

24

<210> 36

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 36

gggtagactc cattactgag gcgtgggcg

29

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
11 août 2005 (11.08.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/073364 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 15/01, 9/02, 1/21, C12P 7/18, 7/28

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/000070

(22) Date de dépôt international :
12 janvier 2005 (12.01.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0400214 12 janvier 2004 (12.01.2004) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
METABOLIC EXPLORER [FR/FR]; Biopôle Clermont-Limagne, F-63360 Saint Beuzire (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MEYNIAL-SALLES, Isabelle [FR/FR]; 15, chemin Montroux, F-31450 Fourquevaux (FR). GONZALEZ, Benjamin [FR/FR]; 15, rue de l'Horloge, F-63200 Riom (FR). SOUCAILLE, Philippe [FR/FR]; Chant Du Coucou, F-31450 Deyme (FR).

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 129, rue Servient, F-69326 Lyon Cedex 03 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 29 septembre 2005

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: ADVANCED MICROORGANISM FOR PRODUCING 1,2-PROPANEDIOL

(54) Titre : MICROORGANISME EVOLUE POUR LA PRODUCTION DE 1,2-PROPANEDIOL

(57) Abstract: The invention relates to a novel method for preparing an advanced microorganism strain for producing 1,2-propanediol by the metabolism of a simple carbon source consisting in preparing a culture under pressure selected in an appropriate culture medium which comprises a simple carbon source, an initial bacterial strain containing a *tpiA* gene deletion and the deletion of at least one gene involved in a glyoxal methyl (propanal) conversion into lactate in order to develop in said initial strain one or several genes involved in a biosynthesis of DHPA into methylglyoxal and, afterwards into 1,2-propanediol towards advanced genes exhibiting an improved 1,2-propanediol synthase activity and in subsequently selecting the strain(s) of advanced microorganisms exhibiting said improved 1,2-propanediol synthase activity. The initial microorganisms, thus obtained advanced microorganisms and a method for preparing 1,2-propanediol and possibly acetone by the advanced microorganisms culture are also disclosed.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un nouveau procédé de préparation d'une souche de microorganismes évolués pour la production de 1,2-propanediol par métabolisme d'une source de carbone simple, ledit procédé comprenant la culture sous pression de sélection dans un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple, d'une souche bactérienne initiale comprenant une délétion du gène *tpiA* et une délétion d'au moins un gène impliqué dans la conversion du méthyl glyoxal (propanal) en lactate, afin de faire évoluer dans ladite souche initiale un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de biosynthèse du DHAP en méthylglyoxal puis en 1,2-propanediol vers des gènes évolués ayant une activité « 1,2-propanediol synthase » améliorée, puis on sélectionne et on isole la ou les souches de microorganismes évolués ayant une activité « 1,2propanediol synthase » améliorée. L'invention concerne également les microorganismes initiaux et les microorganismes évolués ainsi obtenus et un procédé de préparation de 1,2-propanediol et éventuellement d'acétone par culture des microorganismes évolués.

WO 2005/073364 A3



En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/000070

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/01 C12N9/02 C12N1/21 C12P7/18 C12P7/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, FSTA, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/37204 A (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND) 27 August 1998 (1998-08-27) cited in the application	1-3, 5, 7-9, 13-16, 18, 20
A	the whole document	4, 6, 10-12, 17, 19
A	----- ALTARAS NEDIM E ET AL: "Metabolic engineering of a 1,2-Propanediol pathway in Escherichia coli" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 65, no. 3, March 1999 (1999-03), pages 1180-1185, XP002293970 ISSN: 0099-2240 cited in the application abstract; figure 2 page 1185, left-hand column ----- -/-	1-3, 5, 7-9, 13-16, 18, 20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 July 2005

Date of mailing of the international search report

28/07/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Devijver, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2005/000070

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALTARAS NEDIM E ET AL: "Enhanced production of (R)-1,2-propanediol by metabolically engineered Escherichia coli" BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 16, no. 6, November 2000 (2000-11), pages 940-946, XP002293971 ISSN: 8756-7938 cited in the application the whole document	1-20
A	GIRBAL L ET AL: "Regulation of solvent production in Clostridium acetobutylicum" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 16, no. 1, 1998, pages 11-16, XP004101891 ISSN: 0167-7799 the whole document	10-14, 16,18-20
A	CAMERON D C ET AL: "METABOLIC ENGINEERING OF PROPANEDIOL PATHWAYS" BIOTECHNOLOGY PROGRESS, XX, XX, vol. 14, no. 1, 6 February 1998 (1998-02-06), pages 116-125, XP002067772 ISSN: 8756-7938 cited in the application page 122, right-hand column - page 123, left-hand column	1-20
A	TRAN-DIN K ET AL: "FORMATION OF D(-)-1,2-PROPANEDIOL AND D(-)-LACTATE FROM GLUCOSE BY CLOSTRIDIUM SPHENOIDES UNDER PHOSPHATE LIMITATION" ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, BERLIN, DE, vol. 142, 1985, pages 87-92, XP002067777 ISSN: 0302-8933 cited in the application page 91, left-hand column	1-20
A	SNOEP JACKY L ET AL: "Differences in sensitivity to NADH of purified pyruvate dehydrogenase complexes of Enterococcus faecalis, Lactococcus lactis, Azotobacter vinelandii and Escherichia coli: Implications for their activity in vivo" FEMS (FEDERATION OF EUROPEAN MICROBIOLOGICAL SOCIETIES) MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 114, no. 3, 1993, pages 279-283, XP002293972 ISSN: 0378-1097 cited in the application the whole document	5-9

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/000070

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>STEPHENS P E ET AL: "NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE LIPOAMIDE DEHYDROGENASE GENE OF ESCHERICHIA COLI K12" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, vol. 135, no. 3, 1983, pages 519-528, XP008014488 ISSN: 0014-2956 the whole document -& DATABASE UniProt 'Online! 21 July 1986 (1986-07-21), "Dihydrolipoyl dehydrogenase (EC 1.8.1.4) (E3 component of pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenases complexes) (Dihydrolipoamide dehydrogenase) (Glycine cleavage system L protein)." XP002334993 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:DLDH_ECOLI Database accession no. P00391 the whole document -----</p>	15-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2005/000070

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9837204	A	27-08-1998	US 6087140 A	11-07-2000
			AU 6331998 A	09-09-1998
			CA 2281001 A1	27-08-1998
			EP 0972049 A1	19-01-2000
			WO 9837204 A1	27-08-1998
			WO 9928481 A1	10-06-1999
			US 6303352 B1	16-10-2001

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR2005/000070

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/01 C12N9/02 C12N1/21 C12P7/18 C12P7/28

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, FSTA, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 98/37204 A (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND) 27 août 1998 (1998-08-27) cité dans la demande	1-3,5, 7-9, 13-16, 18,20
A	le document en entier	4,6, 10-12, 17,19
A	ALTARAS NEDIM E ET AL: "Metabolic engineering of a 1,2-Propanediol pathway in Escherichia coli" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 65, no. 3, mars 1999 (1999-03), pages 1180-1185, XP002293970 ISSN: 0099-2240 cité dans la demande abrégé; figure 2 page 1185, colonne de gauche	1-3,5, 7-9, 13-16, 18,20

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 juillet 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/07/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Devijver, K

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	ALTARAS NEDIM E ET AL: "Enhanced production of (R)-1,2-propanediol by metabolically engineered Escherichia coli" BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 16, no. 6, novembre 2000 (2000-11), pages 940-946, XP002293971 ISSN: 8756-7938 cité dans la demande le document en entier	1-20
A	GIRBAL L ET AL: "Regulation of solvent production in Clostridium acetobutylicum" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 16, no. 1, 1998, pages 11-16, XP004101891 ISSN: 0167-7799 le document en entier	10-14, 16,18-20
A	CAMERON D C ET AL: "METABOLIC ENGINEERING OF PROPANEDIOL PATHWAYS" BIOTECHNOLOGY PROGRESS, XX, XX, vol. 14, no. 1, 6 février 1998 (1998-02-06), pages 116-125, XP002067772 ISSN: 8756-7938 cité dans la demande page 122, colonne de droite - page 123, colonne de gauche	1-20
A	TRAN-DIN K ET AL: "FORMATION OF D(-)-1,2-PROPANEDIOL AND D(-)-LACTATE FROM GLUCOSE BY CLOSTRIDIUM SPHENOIDES UNDER PHOSPHATE LIMITATION" ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, BERLIN, DE, vol. 142, 1985, pages 87-92, XP002067777 ISSN: 0302-8933 cité dans la demande page 91, colonne de gauche	1-20
A	SNOEP JACKY L ET AL: "Differences in sensitivity to NADH of purified pyruvate dehydrogenase complexes of Enterococcus faecalis, Lactococcus lactis, Azotobacter vinelandii and Escherichia coli: Implications for their activity in vivo" FEMS (FEDERATION OF EUROPEAN MICROBIOLOGICAL SOCIETIES) MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 114, no. 3, 1993, pages 279-283, XP002293972 ISSN: 0378-1097 cité dans la demande le document en entier	5-9

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2005/000070

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>STEPHENS P E ET AL: "NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE LIPOAMIDE DEHYDROGENASE GENE OF ESCHERICHIA COLI K12"</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE,</p> <p>vol. 135, no. 3, 1983, pages 519-528,</p> <p>XP008014488</p> <p>ISSN: 0014-2956</p> <p>le document en entier</p> <p>-& DATABASE UniProt 'Online!</p> <p>21 juillet 1986 (1986-07-21),</p> <p>"Dihydrolipoyl dehydrogenase (EC 1.8.1.4) (E3 component of pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenases complexes) (Dihydrolipoamide dehydrogenase) (Glycine cleavage system L protein)."</p> <p>XP002334993</p> <p>extrait de EBI accession no.</p> <p>UNIPROT:DLDH_ECOLI</p> <p>Database accession no. P00391</p> <p>le document en entier</p> <p>-----</p>	15-17

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2005/000070

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9837204	A	27-08-1998	US 6087140 A 11-07-2000
			AU 6331998 A 09-09-1998
			CA 2281001 A1 27-08-1998
			EP 0972049 A1 19-01-2000
			WO 9837204 A1 27-08-1998
			WO 9928481 A1 10-06-1999
			US 6303352 B1 16-10-2001

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.